

## UN MEDIO DE CULTIVO EXENTO DE NITROGENO COMBINADO PARA EL DESARROLLO DE DIFERENTES ESPECIES BACTERIANAS FIJADORAS DE N<sub>2</sub>

G. M. Frontera (1)

Recibido: 29/7/82

Aceptado: 26/10/82

### RESUMEN

Se comunica en el presente trabajo un medio de cultivo exento de nitrógeno combinado para el crecimiento de bacterias libres aerobias fijadoras de N<sub>2</sub> pertenecientes a las familias de las Azotobacteraceae y Spirillaceae; las especies probadas pertenecen a los géneros: *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azotobacter*, *Azomonas* y *Spirillum*.

Los datos obtenidos están referidos a la velocidad y cantidad de desarrollo de las bacterias, medidas según las recomendaciones de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos. Las mismas fueron estudiadas en cajas de Petri y en tubos conteniendo agar estria con el medio de cultivo exento de nitrógeno combinado. La siembra se efectuó por el método de agotamiento en superficie. Los resultados muestran un desarrollo satisfactorio de las bacterias probadas.

### A CULTURE MEDIUM LACKING IN COMBINED NITROGEN TO DEVELOPMENT DIFFERENT SPECIES NITROGEN FIXING BACTERIA

### SUMMARY

This paper reports a culture medium lacking in combined nitrogen for the growth of free aerobic nitrogen-fixing bacteria belonging to the Azotobacteraceae and Spirillaceae. The genus *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azotobacter*, *Azomonas* and *Spirillum* were examined. The velocity and extent of bacterial growth were considered according to the American Bacteriology Society samples were streaked directly on the surface of the nitrogen-free medium plated in the Petri dishes and agar slant. Results obtained showed a satisfactory growth of the bacteria tested.

---

(1) Cátedra de Microbiología Agrícola, Departamento de Tecnología de Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires. Argentina.

## INTRODUCCION

Entre las bacterias libres aerobias fijadoras de  $N_2$  estudiadas con mayor consideración por su activo aporte de nitrógeno orgánico al suelo, se mencionan las pertenecientes a las familias Azotobacteraceae y Spirillaceae; estas dos familias comprenden especies de los géneros: *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azotobacter*, *Azomonas*, y *Spirillum*, respectivamente, de acuerdo a la clasificación del manual Bergey's (1974) 8a. edición y Bergey's (1957), 7a. edición.

En la bibliografía consultada se comunican medios de cultivos específicos para el desarrollo de cada uno de los géneros de bacterias mencionados ya sea para aislarlos del suelo o para mantenerlos en colección. Así, Becking (1961) lo hace para el género *Beijerinckia*, Jensen *et al.*, (1960) para el género *Derrxia* y Winogradsky (1938) para el género *Azotobacter* y *Azomonas*. Para el género *Spirillum* se menciona el medio Nfb (Dobereiner y Baldani, 1979). Sin embargo, nadie comunica un único medio de cultivo exento de nitrógeno combinado capaz de facilitar el desarrollo de las especies bacterianas de los géneros mencionados anteriormente.

El presente trabajo tiene por objeto probar un medio de cultivo exento de nitrógeno combinado, para lograr el crecimiento y desarrollo de diferentes especies de bacterias libres aerobias fijadoras de  $N_2$  de los géneros *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azotobacter*, *Azomonas* y *Spirillum*, sobre la base del medio de Jensen "A" (1960), con modificaciones en su composición química y en la forma de operar.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizan, para probar el medio de Jensen "A" (1960) modificado, siete especies de bacterias provenientes de la colección de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires, dos especies provenientes de la colección de Em-

brapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria) y una especie proveniente de la colección de bacterias de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía de Azul, según se indica en el Cuadro 1.

CUADRO 1: Especies Utilizadas.

---

<i>Beijerinckia dextrii</i> (1)
<i>Beijerinckia indica</i> (1)
<i>Beijerinckia mobilis</i> (1)
<i>Beijerinckia fluminensis</i> (1)
<i>Azotobacter chroococcum</i> (1)
<i>Azotobacter paspalii</i> (2)
<i>Derrxia gummosa</i> (a) (2)
<i>Derrxia gummosa</i> (b) (1)
<i>Spirillum lipoferum</i> (1)
<i>Azomonas</i> spp (3)

---

- (1) Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía de Buenos Aires.
  - (2) Colección de Embrapa, Brasil.
  - (3) Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía de Azul.
- 

El medio de cultivo que se prueba se compone de: glucosa 3 g, manitol 5 g, sacarosa 2 g, cloruro de calcio 0,1 g, fosfato bipotásico 0,05%, sulfato de magnesio 0,2 g, FeDta 5 ml, sales menores 5 ml, agar 20 g y agua destinada 1 litro; el pH del medio se ajusta a 7.

La solución de elementos menores está compuesta por: carbonato de litio 0,01 g, sulfato de cobre 0,02 g, sulfato de aluminio 0,02 g, ácido bórico 0,22 g, cloruro estannoso 0,01 g, cloruro de manganeso 0,14 g, cloruro de níquel 0,02 g, sulfato de cobalto 0,02 g, cloruro de titanio al (15%) 0,13 ml, ioduro de potasio 0,01 g, bromuro de potasio 0,01 g, molibdato de sodio por 2 de agua 0,04 g, agua destilada: completar hasta 360 ml.

El medio de cultivo propuesto contiene cuatro modificaciones respecto del medio de Jensen "A" (1960), a saber:

- a) No contiene carbonato de calcio.
- b) Contiene sacarosa.
- c) Contiene sales menores.
- d) El fosfato bipotásico se prepara aparte del medio general modificado, esterilizándose

en autoclave a 115°C durante 20 minutos, este se agrega en un volumen calculado proporcional al de la fórmula del medio de Jensen "A" en el momento de utilizarse.

El estudio del desarrollo de las diferentes especies de bacterias libres aerobias fijadoras de N<sub>2</sub> se realiza:

- 1) En cajas de Petri con el medio de cultivo propuesto mediante el método de siembra por agotamiento en superficie, estriándose con ansa de Beijerinck mojada en suspensiones líquidas de cada una de las bacterias ensayadas, en una concentración de 10<sup>7</sup> células por mililitro, se incuban en estufa a 28°C durante 48 hs.
- 2) En tubos con agar inclinado con el medio de cultivo propuesto, registrándose la cantidad del desarrollo después de haber incubado en estufa a 28°C durante 7 días.

Los parámetros usados en ambos casos se basan en las indicaciones establecidas por la Society of American Bacteriologists (1957).

## DISCUSION Y CONCLUSION

Por los resultados registrados en el Cuadro 2, se desprende que las siguientes espe-

cies de bacterias: *Beijerinckia indica*, *Beijerinckia derxii*, *Beijerinckia mobilis*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter chroococcum*, *Derxia gummosa* (1), *Derxia gummosa* (2), *Azotobacter paspalii*, *Azomonas spp* y *Spirillum lipoferum* manifiestan un desarrollo satisfactorio en el medio de cultivo propuesto sobre la base del medio de Jensen "A" (1960), modificado.

Las modificaciones efectuadas en el medio de Jensen "A" (1960) posibilitan que:

- a) Al no contener carbonato de calcio el medio de cultivo desarrolla el pH producto de las segregaciones metabólicas de cada bacteria ensayada.
- b) Con el agregado de sacarosa se aumentan las fuentes de asimilación de glúcidos que pueden utilizar las diez especies bacterianas.
- c) Al contener sales menores se favorecen los requerimientos en microelementos de todas las especies ensayadas.
- d) Con el agregado aparte del fosfato bipotásico, en el momento de realizar la siembra, se disminuiría la posibilidad de inso-

CUADRO 2: Resultados obtenidos

Especies	Desarrollo	
	Velocidad *	Cantidad
<i>Beijerinckia indica</i>	lento	moderado
<i>Beijerinckia derxii</i>	lento	moderado
<i>Beijerinckia mobilis</i>	rápido	abundante
<i>Beijerinckia fluminensis</i>	rápido	abundante
<i>Azotobacter chroococcum</i>	rápido	abundante
<i>Derxia gummosa</i> (a)	rápido	abundante
<i>Derxia gummosa</i> (b)	rápido	abundante
<i>Azotobacter paspalii</i>	lento	moderado
<i>Azomonas spp</i>	rápido	moderado
<i>Spirillum lipoferum</i>	rápido	moderado

\* Rápido: Colonias visibles a las 24 hs de desarrollo.

Lento: Colonias visibles después de las 24 hs de desarrollo.

lubilización del fósforo por reacción con el cloruro de calcio, sal que posee el medio de Jensen "A" (1960).

De lo expuesto se concluye que el medio de cultivo propuesto permite el desarrollo adecuado de todas las especies ensayadas de bacterias libres aerobias fijadoras de  $N_2$ . Por las características de este nuevo medio de cultivo, exento de formas combinadas orgánicas o inorgánicas de nitrógeno, se puede inferir que el ensayo de desarrollo de otras especies bacterianas libres aerobias fijadoras de  $N_2$ , no estudiadas en el presente trabajo, puedan tener un alto porcentaje de éxito.

#### AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Ing. Agr. María Azucena Monzón de Asconegui por facilitarme dos especies bacterianas fijadoras de  $N_2$  provenientes de la colección de EMBRAPA.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Becking, J. H., 1961. Studies on nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I Geographical and ecological distribution in soil. *Plant and Soil*, 14: 49-81.
- 2) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Seventh Ed., 1957. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Ed., 1974. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 4) Dobereiner, J. and V. L. D. Baldani, 1979. Selective infection of mize roots by streptomycin resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria *Canadian J. Microbiol.* 25: 1264-1269.
- 5) Jensen, A. L.; E. J. Petersen; P. K. De; and R. Bhattacharya, 1960. A new nitrogen fixing bacterium, *Dexia gummosa*, nov. gen. nov. spec. *Arch. fur Mikrobiol.* 36: 182-195.
- 6) Society of American Bacteriologists, 1957. Manual of Microbiological Methods, Mc Graw Hill Ed. N. York.
- 7) Winogradsky, S., 1938. Etudes sur la microbiologie du sol. Sur la morphologie et ecologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur*, 60: 351-400.